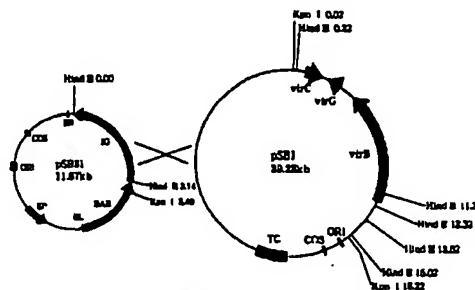
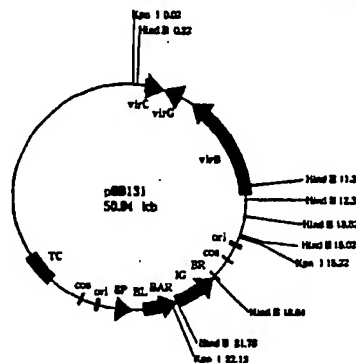


(51) 国際特許分類 6 C12N 15/00, A01H 1/00 // C12N 5/00	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/06722 (43) 国際公開日 1995年3月9日 (09.03.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01442 (22) 国際出願日 1994年9月1日 (01. 09. 94) (30) 優先権データ 特願平5/243975 1993年9月3日 (03. 09. 93) JP 特願平6/27320 1994年1月31日 (31. 01. 94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP] 〒140 東京都品川区東品川四丁目12番62号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 斎藤秀重 (SAITO, Hideaki) [JP/JP] 石田祐二 (ISHIDA, Yuji) [JP/JP] 樋江井祐弘 (HIEI, Yukoh) [JP/JP] 小鞠敏彦 (KOMARI, Toshihiko) [JP/JP] 〒438 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 谷川英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	添付公開書類 国際調査報告書	

(54) 発明の名称 未熟胚の胚盤を用いた単子葉植物の形質転換方法



A method of transforming a monocotyledon which, as compared with the conventional methods, is shortened in the period from the transformation to the regeneration of a plant body, can generally be applied to a plant for which a means for regenerating a plant body from the protoplast is not established as yet, and can dispense with special apparatus, and for which necessary materials are readily available. The method comprises transforming a scutellum of a non-dedifferentiated immature embryo of a monocotyledon with an agrobacterium.



(57) 要約

従来の方法に比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、プロトプラストからの植物体の再生が確立されていない植物に対しても普遍的に適用することができ、特殊な装置を必要とせず、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法が開示されている。本発明は、所望の遺伝子を含有するアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化処理していない未熟胚の胚盤を形質転換し、形質転換個体を得ることからなる、単子葉植物の形質転換方法を提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	J P	日本	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

明細書

未熟胚の胚盤を用いた単子葉植物の形質転換方法

技術分野

本発明は、単子葉植物の形質転換方法に関する。

背景技術

単子葉植物の形質転換方法としては、従来より、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法（PEG法）、パーティクルガン法その他が知られている。

エレクトロポレーション法は、プロトプラストと目的のDNAを混合し、電気刺激で細胞膜に穴を開けることによりDNAを細胞内に導入し形質転換を図る方法である。この方法で種々の遺伝子が単子葉植物、特にイネに導入されている（Toriyama K. et al., 1988; Biotech. 6:1072-1074, Shimamoto K. et al., 1989; Nature 338:274-276, Rhodes C. A. et al., 1988; Science 240:204-207）。しかしながら、この方法は、1) プロトプラストからの個体再生系が確立されている植物種のみに適応可能である、2) プロトプラストから個体再生までには数カ月を要するので、形質転換体を得るのに時間がかかる、3) 培養期間が長期化するので、それに伴う培養変異の頻度が高くなり、正常な形質転換体を得る頻度が低くなる、という問題点を有する。

PEG法は、目的遺伝子とプロトプラストとを混合し、PEGで処理することによって遺伝子の導入を図る方法であり、エレクトロポレーション法とは電気刺激がPEGに変わった点で異なる。導入効率はエレクトロポレーション法よりはいくぶん低いと考えられる。この方法で形質転換体を得た報告はあるものの、広く用いられているとは言い難い。プロトプラストを用いるため、エレクトロポレーション法と同様な問題点を持つ（Zhang W. et al., 1988; Theor. Appl. Genet. 76:835-840, Datta S. K. et al., 1990; Biotech. 8:736-740）。

また最近、弱い酵素処理をしたトウモロコシ未熟胚およびカルスに電気刺激によって遺伝子を導入する方法が報告された（D'Halluin K. et al., 1992; Plant Cell 4:1495-1505）。導入された遺伝子の存在は再分化植物体においても確認されている。しかし、まだこの方法での形質転換の成功例は一報のみである。

パーティクルガン法は、目的の遺伝子を微細な金属粒子に付着させ、金属粒子を高速で細胞あるいは組織に打ち込むことによって形質転換を行わせる方法である。従って、原理的にはあらゆる組織を対象に形質転換を行なうことができ、特にプロトプラストからの再生系が確立されていない植物種に有効であるとされている。

今までにトウモロコシではタイプIIカルス (Armstrong C. L. and Green C. E., 1985; *Planta* 164:207-214) を材料にパーティクルガン法により形質転換を行ない、そこから正常な稔性を有する形質転換体を得た報告がいくつかある (Gordon-Kamm W. J. et al., 1990; *Plant Cell* 2:603-618, Fromm M. E. et al., 1990; *Biotech.* 8:833-839, Walters D. A. et al., 1992; *Plant Mol. Biol.* 18:189-200 Vain P. et al., 1993; *Plant Cell Rep.* 12:84-88)。しかし、これらの報告のほとんどは、培養容易性の品種を材料として使用しており、まだ、あらゆる品種に適用できる技術には至っていない。

Vasil らはパーティクルガンによってコムギのエンブリオジェニックカルスにバスタ、ビアラフォス等の除草剤の主成分であるホスフィノスリシンをアセチル化する *bar* 遺伝子 (Thompson, C. J. et al., 1987; *EMBO J.* 6:2519-2523) と *GUS* 遺伝子を導入し、バスタ抵抗性のカルスおよび再生植物体を得た。これらのカルスおよび再生植物体における、導入遺伝子の産物である酵素の活性を確認し、また *bar* 遺伝子が存在することをサザン分析で確認した (Vasil V. et al., 1992; *Biotech.* 10:667-674)。

Li らはパーティクルガンによってイネの未熟胚およびエンブリオジェニックカルスにハイグロマイシン抵抗性遺伝子を導入後、選抜を行ない、ハイグロマイシン抵抗性再生植物体を得た。この植物体でのハイグロマイシン抵抗性遺伝子の存在をサザン分析で確認した。この後代の種子のハイグロマイシン抵抗性は 3 : 1 の分離が見られた (Li L. et al., 1993; *Plant Cell Rep.* 12:250-255)。

Christou らはパーティクルガンによってイネの未熟胚に *bar*、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子および *GUS* 遺伝子を導入し、ハイグロマイシンまたはビアラフォスに抵抗性で *GUS* 活性を示す植物体を得て、導入遺伝子の存在をサザン分析によって確認した (Christou P. et al., 1991; *Biotech.* 9:957-962)。

Kozzielらはパーティクルガンによってトウモロコシ未熟胚にb a r遺伝子とB t毒素合成遺伝子を導入し、ホスフィノスリシン抵抗性植物体を得た。この植物体はB t毒素蛋白の合成と、サザン分析により導入遺伝子の存在が確認された(Kozziel M. G. et al., 1993; Biotech. 11:194-200)。

その他の方法としては、1) 種子、胚とDNAの共存培養(Topfer R. et al., 1989; Plant Cell 1:133-139, Ledoux L. et al., 1974; Nature 249:17-21)、2) 花粉管への処理(Luo and Wu 1988; Plant Mol. Biol. Rep. 6:165-)、3) リポソーム法(Caboche M. 1990; Physiol. Plant. 79:173-176, Gad A. E. et al., 1987; Theor. Appl. Genet. 75:30-36)があるが、形質転換の効率、再現性、あるいは汎用性に関して問題があり、一般的な方法とは言い難い。

一方、アグロバクテリウム属細菌のT iプラスミドをベクターとして用いた遺伝子導入法は、タバコ、ペチュニア、ナタネ等の双子葉作物の形質転換法として普遍的に用いられている。しかしながら、アグロバクテリウム属細菌の宿主は双子葉植物のみに限られ、単子葉植物には寄生しないとされている(De Cleene M. 1976; Bot. Rev. 42:389-466)。

アグロバクテリウムによる単子葉植物の形質転換に関してはアスパラガス(Bytebier B. et al., 1987; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:5345-5349)、そしてヤム(*Dioscorea bulbifera*) (Schaferw, et al., 1987; Nature 327: 529-532)で報告されているが、その他の単子葉植物、特にイネ科作物にはこの方法を適用できないとされている(Potrykus I. 1990; Biotechnology 8:535-543)。

GrimsleyらはアグロバクテリウムのT-DNAの中にトウモロコシストリークウイルス(Maize streak virus)のDNAを挿入したものをトウモロコシ生長点に接種したところ、トウモロコシストリークウイルスの感染を確認したことを報告している。トウモロコシストリークウイルスのDNAを接種しただけではこのような感染症状が認められないことから、上の観察はアグロバクテリウムがトウモロコシにDNAを導入することができることを示すものと解釈している(Grimsley et al., 1987; Nature 325:177-179)。しかし、ウイルスは核ゲノムに組み込まれなくても増殖する可能性があるので、この結果はT-DNAが核

に組み込まれたことを示すものではない。その後、感染効率はトウモロコシの茎頂の生長点に接種したときが最も高く (Grimsley et al., 1988; Biotech. 6:185-189)、感染にはアグロバクテリウムのプラスミドの *vir C* 遺伝子が必須であることを示した (Grimsley et al., 1989; Mol. Gen. Genet. 217:309-316)。

Gould らはトウモロコシの生長点に針で傷をつけた後カナマイシン抵抗性遺伝子と *GUS* 遺伝子を持った強病原性アグロバクテリウム *EHA1* を接種し、処理後の生長点をカナマイシンで選抜したところ、抵抗性を示す植物体を得た。この後代の種子が導入した遺伝子を持つことを確認するためサザン分析を行ったところ、一部の種子で導入遺伝子が確認された (Gould J. et al., 1991; Plant Physiol. 95:426-434)。このことはアグロバクテリウム処理された生長点からカナマイシン選抜により得られた植物体には形質転換細胞と非形質転換細胞が混在していたことを示す (キメラ現象)。

Mooney らは、アグロバクテリウムを用いて小麦の胚にカナマイシン抵抗性遺伝子の導入を試みた。まず、胚を酵素で処理し、細胞壁に傷をつける処理をし、その後アグロバクテリウムを接種した。処理したカルスのうち極めて少数のカナマイシン抵抗性と思われるカルスが増殖したが、このカルスから植物体の再生はできなかった。また、カナマイシン抵抗性遺伝子の存在をサザン分析で確認したところ、全ての抵抗性カルスで導入遺伝子の構造変異がみられた (Mooney P. A. et al., 1991; Plant Cell, Tissue, Organ Culture 25:209-218)。

Raineri らはイネの胚盤に傷をつけた後、強病原性のアグロバクテリウム *A281* (pTiBo542) をイネの 8 品種に処理したところ、日本晴、藤坂 5 号の 2 品種で腫瘍状の組織の増殖がみられた。さらに、*T-DNA* からホルモン合成遺伝子を除いた *Ti* プラスミドにカナマイシン抵抗性遺伝子と *GUS* 遺伝子を挿入したプラスミドを持つアグロバクテリウムをイネの胚に接種したところカナマイシン抵抗性カルスの増殖がみられた。この抵抗性カルスでは *GUS* 遺伝子の発現が認められたが、形質転換植物を得ることはできなかった。これらのことから、アグロバクテリウムの *T-DNA* がイネの細胞に導入されたと解釈している (Raineri et al., 1990; Biotech. 8:33-38)。

このように、イネ、トウモロコシ、コムギ等のイネ科の作物でもアグロバクテ

リウムによる遺伝子導入が可能であることを示唆する研究報告が現れてきているが、何れも再現性に問題があるほか、導入した遺伝子の確認についても不完全で、説得できる結果が示されていなかった (Potrykus I. 1990; Biotech. 8:535-543)。

Chanらは2, 4-D共存下で2日間培養したイネ未熟胚に付傷後、ジャガイモ懸濁培養細胞を含む培地中でnpt II遺伝子とGUS遺伝子を持ったアグロバクテリウムを接種した。処理した未熟胚をG418添加培地上で培養したところ誘導されたカルスから再分化植物体が得られた。再分化植物体およびその後代の植物体でのGUS遺伝子の所在をサザン分析で確認したところ、再分化当代、後代いずれの植物体でも導入遺伝子の存在が認められたことを報告している (Chan M. T. et al., 1993; Plant Mol. Biol. 22:491-506)。この結果は、アグロバクテリウムによるイネの形質転換を支持するものであるが、形質転換効率は1.6%と非常に低く、供試した未熟胚数250に対し、正常な生長を示した再生植物体は1個体に過ぎなかった。イネの未熟胚を摘出するには多大な労力を要するため、このように低い形質転換効率では実用的なレベルにあるとは言い難い。

発明の開示

上述のように、イネ科作物における遺伝子導入法は、エレクトロポレーション法およびパーティクルガン法が主流である。エレクトロポレーション法の場合、プロトプラストを用いるため、再生植物を得るまで長期間を要し、多大な労力がかかり、また長期間の培養により高頻度で変異体が出現するという危険性がある。また、この方法はプロトプラストからの再分化系が確立されていない作物、例えばトウモロコシには適用できない。細胞をプロトプラスト化しない程度の酵素処理をした未熟胚に電気刺激により遺伝子導入を行なう方法 (D'Halluin K. et al., 1992) も報告されているが、まだ成功例は一例のみであり、今のところ一般的な手法とは言い難い。そこで、上述のように、トウモロコシに対しては、タイプIIカルスあるいは未熟胚を用いたパーティクルガン法が試みられている。パーティクルガンを用いた場合、形質転換体を得られる可能性は高いが、パーティクルガンという特別な装置が必要であり、この装置なしには形質転換は不可能である。また微細な金属微粒子の飛散による、実験者に対する危険性も考えられ

る。またトウモロコシに対しては、生長点組織にアグロバクテリウムを感染させることが試みられている (Gould J. et al., 1991)。しかし生長点を単離する作業は多くの労力を要し、大量に調製することは必ずしも容易ではない。また本願発明者がこの手法によってトウモロコシ形質転換体の作出を試みたが、形質転換体は得られなかった (表1)。

従って、本発明の目的は従来の方法に比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、プロトプラストからの植物体の再生が確立されていない植物に対しても普遍的に適用することができ、特殊な装置を必要とせず、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法を提供することである。

本願発明者らは、アグロバクテリウムで処理する単子葉植物の植物組織、アグロバクテリウムの処理条件、及びバイナリーベクターの構成等が遺伝子導入効率に及ぼす影響等を鋭意研究した結果、単子葉植物の脱分化処理していない未熟胚をアグロバクテリウム属細菌を用いて飛躍的に高い効率で形質転換ができること、そしてこの方法には再現性があり、これによれば上記目的を達成することができることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、所望の遺伝子を含有するアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化処理していない未熟胚の胚盤を形質転換することから成る、単子葉植物の形質転換方法を提供する。

本発明の方法により、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ等のイネ科植物を始めとする単子葉植物に目的の外来遺伝子を再現性良く導入することが初めて可能になった。アグロバクテリウムを用いた単子葉植物の形質転換方法はこれまでもあるが、前述のとおり確立された方法とはいえない。しかし、本発明ではこれまでに用いられていない脱分化処理していない未熟胚に本発明で改良した方法でアグロバクテリウムを接種することにより、極めて容易に遺伝子を導入することができた。本発明の方法では材料調製が容易な未熟胚を用いるので、生長点を用いる従来技術に比べて供試材料を容易に得ることができる。また、形質転換は未熟胚の胚盤になされるため、プロトプラストを形質転換する場合に比べて植物体再生までの時間が短く、変異の頻度が低下する。また、スーパーバイナリーベクターを用いれば、トウモロコシや一部のイネ品種のように培養が困難な品種

にも高い効率で遺伝子を導入することが可能である。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の方法に用いることができるアグロバクテリウム属細菌に含まれるプラスミドの一例であるpTOK162の構造と本発明の実施例で用いたプラスミドpTOK232の構築方法を示す図である。

図2は、図1と同様にpSB1の構造とプラスミドpSB131の構築方法を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法により形質転換される単子葉植物は、特に限定されるものではなく、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、アスパラガスその他、いかなる単子葉植物にも適用可能である。もっとも、イネ、トウモロコシ、オオムギ及びコムギ等を包含するイネ科植物が好ましく、とりわけトウモロコシが好ましい。

本発明において、未熟胚とは受粉後の登熟過程にある未熟種子の胚を言う。また、本発明の方法に供される未熟胚のステージ（熟期）は特に限定されるものではなく、受粉後いかなる時期に採取されたものであってもよい。もっとも、受精後2日以降のものが好ましい。また、後述の形質転換後、後述の方法により、脱分化し、正常な個体を再生する能力を有するカルスを誘導できる未熟胚胚盤を用いることが好ましい。また、未熟胚はインブレッド、インブレッド間のF1、インブレッドと自然受粉品種間のF1、市販F1品種の未熟胚であることが好ましい。

また、本発明において、脱分化処理とは、植物組織の分化した細胞を脱分化培地において培養し、無秩序に増殖するカルス等の未分化状態の細胞塊を得るための処理である。

形質転換に用いられるアグロバクテリウム属細菌は、Tiプラスミド又はRiプラスミドを持つ、従来より双子葉植物の形質転換に用いられているものを用いることができる。これらのものの多くはAgrobacterium tumefaciens 由来のTiプラスミドのヴィルレンス領域（vir 領域）由来のDNA領域を含むベクターを有しており、植物に付与しようとする形質を担う遺伝子はこのベクター中に挿入されるか、またはこのベクターとは別のプラスミド中に存在し、相同組換え等に

より T i プラスミド中に in vivo で挿入されるものである。また、小鞠らは、Agrobacterium tumefaciens A 2 8 1 という強病原性の、形質転換効率が極めて高い株 (Hood, E. E. et al., 1984; Biotech. 2:702-709、Hood, E. E. et al., 1986; J. Bacteriol. 168:1283-1290、Komari, T. et al., 1986; J. Bacteriol. 166:88-94、Jin, S. et al., 1987; J. Bacteriol. 169:4417-4425、Komari, T., 1989; Plant Science 60:223-229、A T C C 3 7 3 4 9) に含まれる T i プラスミド pTiBo542 のヴィルレンス領域 (vir 領域) 由来の DNA 領域を含むベクター (本明細書において、このベクターを「スーパーバイナリーベクター」と呼ぶことがある) を開発した (特開平 4 - 2 2 2 5 2 7 号)。本発明では、このようなスーパーバイナリーベクターを好ましく用いることができる。

このようなスーパーバイナリーベクターの例として pTOK162 (特開平 4 - 2 2 2 5 2 7 号) を挙げるることができる。その構造を図 1 に示す。このプラスミドは、大腸菌および Agrobacterium tumefaciens 中で増殖可能である pTOK154 と呼ばれるプラスミド (T i プラスミドから誘導された公知の pGA472 プラスミドと pVCK101 と呼ばれる公知の広宿主域プラスミドから後述の方法により構築された、T 領域を含むプラスミド) に pTiBo542 のヴィルレンス領域由来の既にクローン化されていた上記 1 5 . 2 キロベースの KpnI 断片 (virB, virG, VirC 各遺伝子を含む) を組み込んだものである。この pTOK154 には、T 領域の 2 つの境界配列とその間に単子葉植物に導入しようとする遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子が配列されており、この例は、単子葉植物に導入しようとする遺伝子が pTiBo542 のヴィルレンス領域由来のクローン化された DNA 断片を含有するプラスミド上に配置されている例である。

単子葉植物に組み込もうとする所望の遺伝子は、上記プラスミドの T - DNA 領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、プラスミドが有する薬剤耐性等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。もっとも、図 1 に示す pTOK162 のように、大型で多数の制限部位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所望の DNA を T 領域内に導入することが必ずしも容易でないことがある。このような場合には Agrobacterium tumefaciens 細胞内の in vivo 系での相同組換え (Herrera-Estrella, L. et al., 1983; EMBO J. 2:987

-995、Horsch, R. H. et al., 1984; Science 223:496-498) を利用することにより、目的のDNAをpTOK162 に導入することが可能になる。すなわち、例えば、先ず、pTOK162 を Agrobacterium tumefaciens に導入しておいて、この菌をさらに所望DNAを導入したpBR322と呼ばれるプラスミド（類似のプラスミドを含む）を導入する。pTOK162 のDNAにはpBR322と相同な部分があるので、pBR322誘導体は相同配列を介した組換えによりpTOK162 に組み込まれることになる。pBR322はpTOK162 と異なり Agrobacterium tumefaciens 中では複製できないので、このような組み込まれた状態（pTOK162::pBR322 誘導体という）でなければ Agrobacterium tumefaciens 中で生存することができない。そして、pTOK162 とpBR322誘導体の各々に特異的な特性（薬剤耐性等）について選抜すれば、pTOK162::pBR322 誘導体を有する Agrobacterium tumefaciens を得ることができる。さらに、pTOK162 を有する Agrobacterium tumefaciens に各種のプラスミドを導入して研究したところ、pBR322誘導体の選抜マーカーとしては、トランスポゾンTn7（De Greve, H. H. et al., 1981; Plasmid 6:235-248 ）由来のスペクチノマイシン耐性遺伝子（SP）が優れていることが判明した。従って、すでに所望の遺伝子がpBR322にクローン化されている場合には、SP遺伝子をそのプラスミドに挿入すれば、Agrobacterium tumefaciens 内の相同組換えにより、pTOK162 のT領域に所望の遺伝子を導入することができる。またその他の場合には、pBR322由来のDNAとSP遺伝子から構成されるプラスミドを用意しておいて、これに所望の遺伝子を挿入する方法も考えられる。この際、T領域の境界配列を活用すれば、最終的に、pTOK162 上において、カナマイシン耐性遺伝子と所望の遺伝子を別々のT領域中に配置することも可能である。カナマイシン耐性をマーカーとして植物を形質転換した場合、両T領域とも導入される場合も相当の比率で生じるわけであるので、目的遺伝子の導入は十分達成できる。また、両T領域が別々の染色体に組み込まれる場合もあり得るので、後に目的の遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子から分離することも可能となる。

寄主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、Agrobacterium tumefaciens を好ましく用いることができる。

プラスミドを Agrobacterium tumefaciens 等のアグロバクテリウム属細菌に導

入する操作は従来法により行うことができ、例えば、細菌の三系交雑手法 (Ditta, G. et al., 1980; Pro. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351) により行うことができる。

このようにして調製されるアグロバクテリウム属細菌には、pTOK162 由来のウィルレンス能力の高いDNAが含まれるので、高い効率で単子葉植物の形質転換を行うことが可能である。

尚、本発明においては、単子葉植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様にT領域の境界配列の間に配置されるものであるが、アグロバクテリウム属細菌中で、Tiプラスミド上に配置されてもよく、または他のプラスミド上に配置されてもよい。

アグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の未熟胚を形質転換する方法は、未熟胚をアグロバクテリウム属細菌と単に接触させることにより行うことができる。例えば、 $10^6 \sim 10^{11}$ 細胞/ml程度の細胞濃度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に未熟胚を3～10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培養することにより行うことができる。形質転換に供する未熟胚は、2, 4-D共存下での培養等の脱分化処理を行うことなく、未熟胚をそのまま形質転換処理に供する。従来、アグロバクテリウム属細菌を用いた植物の形質転換方法では、アグロバクテリウム属細菌と接触させる前に、2, 4-Dとの共存培養等の脱分化処理を行っていたが、本願発明者らはこの脱分化処理が不要であることを見出した。よって、本発明の方法は、従来の方法に比べて簡便であるという利点を有する。さらに、植物によっては、特にトウモロコシでは、形質転換処理の前に脱分化処理を行うと、形質転換効率が低下するので、このような植物では、前処理を行わない本発明の方法により形質転換効率を高めることができる。また、従来、アグロバクテリウム属細菌で植物を形質転換する際に、感染効率が高くなるように、植物に傷をつけたり、酵素処理して細胞壁をある程度溶解してからアグロバクテリウム属細菌を感染させていた。本発明の方法では、このような前処理を行ってもよいが、本願発明者らは、このような前処理を行わなくても効率良く形質転換が行えることを見出した。特に、トウモロコシの場合には、付傷すると形質転換後にカルスへ誘導する効率が低下するので、このような

前処理を行わないことが好ましい。

形質転換した未熟胚は、その後、公知の方法 (Green, C.E. and Phillips, R. L., 1975; Crop Science 15: 417-421, Duncan, D.R. et al., 1985; Planta 165: 322-332) により脱分化され、脱分化状態で形質転換細胞の選抜、増殖を行うことが好ましい。選抜は、前記所望の遺伝子の発現に基づいて行うことができる。脱分化状態の細胞は、正常個体再生能力を有するカルスであることが好ましい。形質転換細胞からの植物体の再生は公知の方法 (Luppotto, E. and Lusardi, H.C. 1988; Maydica XXXIII:163-177) により行うことができる。これにより所望の形質を獲得した植物体、好ましくは、所望の形質を獲得し、正常稔性を有する形質転換植物体を再生することができる。なお、これらの具体的操作の一例が下記実施例に詳述されている。

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

(1) 供試組織の調製

(i) トウモロコシの品種

トウモロコシ品種 P3732、A188、H84、B37Ht、Mol7Ht、W117Ht、Oh43、H99、W64A Ht rhm、F1 (A188 x Black Mexican Sweet)、F1 (A188 x B73Ht)、F1 (B73Ht x A188)、F1 (H84 x A188)、F1 (Mol7Ht x A188)、F1 (C103 x A188) を材料として選定した。P3732 は磐田酪農協同組合より入手。全てのインブレッド及びBlack Mexican Sweet のいずれの品種も農林水産省生物資源研究所から入手した。

(ii) イネの品種

日本稲品種、月の光を選定して供試した。

(iii) トウモロコシ茎頂組織の調製

トウモロコシ種子を70% エタノールに1分間、1%次亜塩素酸ナトリウムに5分間浸漬後滅菌水で3回洗浄した。洗浄後L S固体培地 (L S主要塩類、L S微量塩類 (Linsmaier E. and Skoog F. 1965; Physiol. Plant. 18:100-127)、0.5 mg ml ニコチン酸、0.5 mg lピリドキシン塩酸塩、1 mg lチアミン塩酸塩、100

mg 1 ミオイノシトール、100 mg/l カザミノ酸、700 mg/l プロリン、20 g/l ショ糖、2.3 g/l ゲルライト) に置床し 25℃、照明下で培養した。約 4 日後、発芽した幼苗から頂端分裂組織を含む約 0.1 × 0.3 mm の組織を切り出し材料とした。

(iv) トウモロコシ未熟胚の調製

花粉受粉後約 14 日目に雌穂から長さ 1 ~ 2 mm の未熟胚を無菌的に単離した。

(v) イネ未熟胚の調製

開花後、7 ~ 12 日目の未熟種子を穎を除去した後、70% エタノールに 30 秒、1% 次亜塩素酸ナトリウムに 10 分間浸漬することにより消毒した後、未熟胚を取り出し供試材料とした。

(2) Ti プラスミド

ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (HPT)、ホスフィノスリシン (PPT) 抵抗性遺伝子 (bar) および GUS 遺伝子を Ti プラスミドの T-DNA 領域に組み込んだ、以下のプラスミドを作製した。

(i) pIG121Hm:

ヒマのカタラーゼ遺伝子の第 1 イントロンを含む GUS 遺伝子と、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子と連結したプラスミド (中村ら、1991; 植物バイオテクノロジー II (現代化学増刊、pp. 123-132)。名古屋大学、中村氏より入手)。

(ii) pTOK232:

(a) イントロン GUS およびハイグロマイシン抵抗性遺伝子の中間ベクター pTOK229 への導入

Tn 7 由来のスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含む ClaI 断片 (2.5 kb) をクレノー処理により末端を平滑化し、これを pUC19 の SmaI 部位に挿入し、アンピシリンおよびスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を持つプラスミド pTOK107 (5.2 kb) を得た。pTOK107 を EcoRI、HindIII で処理し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含む 2.5 kb 断片を pGA482 の EcoRI、HindIII 断片 (2.7 kb) と連結し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子と HindIII、HpaI 部位を含む pTOK170

(5. 2 k b)を得た。

3 5 Sプロモーターにヒマのカタラーゼの第1イントロンとG U S遺伝子を連結したベクターp I G 2 2 1 (Ohta et al., 1990, 名古屋大学中村氏より譲渡)をE c o R Iで切断後クレノー酵素により末端を平滑化しH i n d I I I リンカー(p C A A G C T T G ; タカラ酒造コード4 6 6 0 P)を挿入した。3 5 SプロモーターおよびイントロンG U Sを含む断片をH i n d I I I により切り出し、3 5 Sプロモーターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子を連結したp G L 2 (J. Paszkowski, Friedrich Miescher Institute より入手)のH i n d I I I 部位に挿入しp G L 2 - I G (7. 6 k b)を得た。なお、p G L 2 はp D H 5 1 (Pietrazak et al., 1986; Nucleic Acids Research 14: 5857-5868)にハイグロマイシン抵抗性遺伝子(Gritz L. and Davis J. 1983; Gene 25:179-188)を挿入したものである。p T O K 1 7 0をH p a I処理して得られた断片をp G L 2 - I GのP v u I I断片(5. 2 k b)と連結しp T O K 2 2 9 (10. 1 k b)を得た。

(b) スーパーバイナリーベクターp T O K 1 6 2への導入

スーパーバイナリーベクターに強病原性アグロバクテリウムA 2 8 1由来のv i r B、v i r C、v i r G遺伝子を挿入して得たスーパーバイナリーベクターp T O K 1 6 2への目的遺伝子(ハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンG U S遺伝子)の導入は相同組換えによって行なった。すなわち、両ベクターは大腸菌プラスミドp B R 3 2 2に由来する部位を持つので、スペクチノマイシン、カナマイシンで選抜された菌には両プラスミドの組換えによって生じたプラスミドのみが含まれることになる。スーパーバイナリーベクターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンG U S遺伝子が組み込まれたプラスミドをp T O K 2 3 2と呼ぶ(図1参照)。

なお、図1及び後述の図2において、「S P」はスペクチノマイシン抵抗性遺伝子、「H P T」はハイグロマイシン抵抗性遺伝子、「N P T」はカナマイシン抵抗性遺伝子、「T C」はテトラサイクリン抵抗性遺伝子、「B A R」はホスフィノスリシン抵抗性遺伝子、「I G」はイントロンG U S遺伝子、「B R」はT-D N Aの右ボーダー配列、「B L」はT-D N Aの左ボーダー配列、

「v i r B, C, G」は強病原性アグロバクテリウム A 2 8 1 由来の v i r 領域、「O R I」は C o l E 1 の複製開始点、「C O S」はラムダファージの C O S 部位、「K」は制限酵素 K p n I 部位、「H」は制限酵素 H i n d I I I 部位を示す。

(i i i) pSB131

(a) pSB131 の構築

pTOK170 を BamH I および BgI I I で切断後閉環し、pYS138 とした。pYS138 を EcoR I および Asp718 I で切断し、T4 DNA ポリメラーゼ処理後、Sal I リンカー (5'-GGTCGACC-3') を挿入し閉環し pYS151 を作成した。pYS151 を Sal I で切断し、この部位に、pGA643 (An et al., Plant Molecular Biology Manual A3:1-19, Kluwer Academic, Dordrecht、1988) の T-DNA を含む 4.7 kb の Sal I 断片を導入し pTOK235 を作成した。pTOK235 を SacI I 部位で切断し、T4 DNA ポリメラーゼにより平滑末端化後、HindI I I リンカー (5'-CAAGCTTG-3') を挿入し閉環し、得られたプラスミドを pTOK246 と命名した。pTOK246 を HindI I I および EcoR I で切断し、T-DNA 中の大部分の DNA を除去した後、35S プロモーターにホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (特表平 1-503434) を接続した遺伝子 (b a r 遺伝子、植物にホスフィノスリシン耐性を付与する能力を有する) を含む 2.2 kb の HindI I I-EcoR I 断片を挿入し pSB25 を得た。さらに、pSB25 を HindI I I で切断し、pIG221 より単離した、35S プロモーターとイントロン GUS を含む 3.1 kb の HindI I I 断片を挿入し pSB31 を作製した。すなわち、pSB31 は、T-DNA 領域中に、植物中で発現するイントロン GUS 遺伝子とホスフィノスリシン耐性遺伝子 (b a r) を含む中間ベクターである。

(b) pNB1 の構築

pVCK101 (Knauf et al., Plasmid 8:45-54、1982) を EcoR I により切断し、T4 DNA ポリメラーゼで処理後閉環することによって EcoR I 部位を削除した。さらに、BgI I I で切断後閉環する操作を行ったところ、BgI I I 部位が削除できたので、このプラスミドを pVCK101Q と命名した。pVCK101Q を HindI I I と XhoI で切断し、HindI I I-Sal I で切断した pUC18 と結合し pTOK150 を作成した。pTOK150 を HindI I I で切断し、T4 DNA ポリメラーゼ処理後 EcoR I リンカー (5'-CCGAATTCGG-

3') を挿入し閉環することにより、HindIII 部位をEcoRI 部位に変換し、pTOK239 とした。pGA482をHpaIで切断し、XhoIリンカー (5'-CCTCGAGG-3') を挿入し閉環してpTOK236 を作成した。pTOK236 をXbaIおよびEcoRI で分解し、2.6 kb 断片を単離した。pTOK239 をEcoRI およびXbaIで切断し、2.7 kb 断片を除去し、pTOK236 の2.7 kb XbaI-EcoRI 断片を挿入し閉環してpNB1を作成した。pNB1は、アクセプターベクターの1種であるが、T-DNAやヴィルレンス領域由来のDNAなどは含んでいない。

(c) pSB1の構築

pNB1をKpnIで切断し、pTiBo542 (American Type Culture Collection 受託番号37349) のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含む15.2 kb KpnI断片を挿入して閉環してpSB1とした。pSB1は、アクセプターベクターの一種であり、これに、T-DNAを含む中間ベクターを組込んだハイブリッドベクターを作成した場合、ヘルパープラスミドと組み合わせることにより、スーパーバイナリーベクターを構成することができる。

(d) pSB31 のpSB1への導入

pTOK232 の場合と同様に、pSB31 を相同組換えによってpSB1に導入することによってpSB131を作出した (図2参照)。

(3) 寄主アグロバクテリウム

T-DNA 領域を削除した菌系、LBA4404 とEHA101とを寄主バクテリアとして使用した。LBA4404 はヘルパープラスミド (vir 領域を完全な形で持つ) PAL4404 を有する菌系であり、American Type Culture Collectionより入手可能である (ATCC 37349)。EHA101はヘルパープラスミドのvir 領域が強病原性アグロバクテリウムA281由来であり、Hood E. E. et al. 1986 (上掲) から入手可能である。

(2) 項で述べた種々のバイナリーベクターをこれら2種類のアグロバクテリウムに導入し、以下の菌系を遺伝子導入用として用いた。これらのプラスミドをアグロバクテリウムに導入する方法は細菌の三系交雑手法 (Ditta G. et al., 1980; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351) によった。

LBA4404(pTOK232)

LBA4404(pSB131)

EHA101(pIG121Hm)

(4) アグロバクテリウム懸濁液の調整

AB培地 (Drlica K. A. and Kado C. I. 1974; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:3677-3681) 上で3~10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかきとり、トウモロコシへの接種には細菌懸濁用LS培地 (LS主要塩類、LS微量塩類、0.5 mg/ml ニコチン酸、0.5 mg/lピリドキシン塩酸塩、1 mg/lチアミン塩酸塩、100 mg/lミオイノシトール、1.5 mg/l 2, 4-D、1 g/l カザミノ酸、100 μ Mアセトシリンゴン、0.2 M ショ糖、0.2 M グルコース) に、イネへの接種には修正AA培地 (AA主要無機塩類、AAアミノ酸及びAAビタミン類 (Toriyama K. and Hinata K. 1985; Plant Sci. 41:179-183)、MS微量塩類 (Murashige, T. and Skoog, F. 1962; Physiol. Plant. 15:473-497)、1.0 g/l カザミノ酸、100 μ Mアセトシリンゴン、0.2 M ショ糖、0.2 M グルコース) に各々懸濁し、菌濃度を3~5 x 10⁹ 細胞/mlに調整し用いた。

(5) 接種および培養条件

供試組織を滅菌水で洗浄後、茎頂組織はガラス針 (自家製) で穿刺後、未熟胚はそのまま上述のアグロバクテリウム懸濁液に3~10分間浸漬した。浸漬処理後、茎頂組織は100 μ Mアセトシリンゴン、20 g/lショ糖、10 g/lグルコースを含む修正LS培地 (LS主要塩類、LS微量塩類、0.5 mg/ml ニコチン酸、0.5 mg/lピリドキシン塩酸塩、1 mg/lチアミン塩酸塩、100 mg/lミオイノシトール、0.1 mg/lカイネチン、1.0 mg/lカザミノ酸、2.3 g/l ゲルライト) に移植し、25℃、照明下で2~3日間培養した。その後、250 mg/lセフトキシムを含む滅菌水で洗浄し、同濃度のセフトキシムを含むLS培地で培養を続けた。浸漬処理後のトウモロコシ未熟胚は100 μ Mアセトシリンゴン、20 g/lショ糖、10 g/lグルコースを含むLSD1.5共存培地 (LS主要塩類、LS微量塩類、0.5 mg/ml ニコチン酸、0.5 mg/lピリドキシン塩酸塩、1 mg/lチアミン塩酸塩、100 mg/lミオイノシトール、1.5 mg/l 2, 4-D、700 mg/l プロリン、500 mg/l MES、8 g/l 寒天) に移植し、25℃、暗黒下で1~5日間培養した。その

後、洗浄することなく（洗浄すると形質転換植物の再生効率が低下）接種未熟胚を250 mg/l セフトキシムを含むLSD 1.5カルス増殖培地（LSD 1.5共存培地からグルコース、アセトシリンゴンを除いた組成）で培養を続けた。また、浸漬処理後のイネ未熟胚はアセトシリンゴン、ショ糖、グルコースを同濃度で含む2N6固体培地（N6の無機塩およびビタミン類（Chu C. C. 1978 Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking, pp 43-50）1 g/l カザミノ酸、2 mg/l 2, 4-D、2 g/l ゲルライト）に移植し、25℃、暗黒下で2～5日間培養した。その後、接種未熟胚を250 mg/lセフトキシムを含む滅菌水で洗浄し、同濃度のセフトキシムを含む2N6固体培地で3日～1週間培養を行なった。

（6）GUS活性の調査方法

共存培養処理直後、組織を0.1% Triton X-100 を含む0.1 M リン酸緩衝液(pH6.8)に浸漬し、37℃で1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを除去した後、1.0 mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルクロン酸(X-gluc)および20% メタノールを含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で24時間処理した後、青色の呈色を示す組織を顕微鏡下で観察し、供試組織数に対する百分率で表した。また、選抜処理後得られた形質転換細胞と考えられるハイグロマイシンあるいはホスフィノスリシン抵抗性カルスおよび形質転換植物体でのGUS活性の判定に際しては、抵抗性カルスおよび植物体の一部を切り取り同様な方法によりGUS染色を行った。

（7）形質転換細胞の選抜と植物体再分化

アグロバクテリウムを接種したトウモロコシ未熟胚を250 mg/lセフトキシムおよび0～100 mg/lハイグロマイシンまたは0～20 mg/l PPT を含むLSD 1.5カルス増殖培地で約8週間培養し抵抗性のカルスを選抜した。この抵抗性カルスを30 mg/l ハイグロマイシンまたは0～20 mg/l PPT を含むLSZ培地（LSD 1.5カルス増殖培地から2, 4-Dを除き、50 mg/l ゼアチンを加えた組成）に置床し、25℃照明下で培養し再分化を行った。

イネ未熟胚を250 mg/lセフトキシムおよび50 mg/lハイグロマイシンを含む2N6固体培地で3～4週間培養し、抵抗性のカルスを選抜した。さらに、こ

の抵抗性カルスを100 mg/lハイグロマイシンを含むN 6 - 7 培地 (N 6 無機塩類、N 6 ビタミン類、2 g/l カザミノ酸、1 mg/l 2, 4-D、0.5 mg/l 6 BA、30 g/l ソルビトール、20 g/l ショ糖、2 g/l ゲルライト) で 2~3 週間培養したのち、50 mg/l ハイグロマイシンを含む植物体再生用のN 6 S 3 培地 (1/2 濃度N 6 主要無機塩類、N 6 微量無機塩類、N 6 ビタミン類、1 g/l カザミノ酸、0.2 mg/l NAA、1 mg/l カイネチン、3 g/l ゲルライト) に移植した。なお、培地にはすべて 250 mg/l セフトキシムを添加した。

(8) トウモロコシ形質転換次世代における導入遺伝子の発現

LBA4404(pSB131) を接種しPPT 選抜により得られた形質転換当代植物を自殖し次世代種子を得た。これらの種子を播種後約2 週間目の幼苗から葉片を採取しGUS 遺伝子の発現を調査した。またこれらの幼苗の葉の一部に500 倍に希釈したバスタ (Hoechst, PPTを主成分とする除草剤) 液を塗布し2 週間目にPPT 抵抗性を調査した。さらに形質転換当代植物を非形質転換植物 (品種A188) と交配後約2 週間目の未熟胚を採取し10 mg/l PPT を含むLSD1.5カルス誘導培地に置床した。25℃、暗黒下で3 週間培養後カルス形成の有無を指標にPPT 抵抗性を調査した。LBA4404(pTOK233)を接種しハイグロマイシン選抜により得られた形質転換植物も非形質転換植物 (品種A188) と交配し、次世代植物の幼苗でGUS 遺伝子の発現を調査した。

(9) サザン法による導入遺伝子の分析

菌系LBA4404(pSB131) を接種し、PPT 選抜により得られた形質転換体当代および次世代のトウモロコシ幼苗から小鞠らの方法 (Komari et al., 1989; Theor. Appl. Genet. 77:547-552)に従いDNAを抽出し、抽出したDNAに制限酵素BamHI を処理し、GUS 遺伝子およびbar 遺伝子をプローブとしたサザン法による導入遺伝子の検出を行った。T-DNA内部のBamHI サイトからLボーダー配列の末端までのDNA領域の長さはGUS 遺伝子で約2.3kb、bar 遺伝子で約2.7kb である (図2)。なおサザン法についてはMolecular Cloning (Sambrook et al. 1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press) に記載の方法に従って行った。

(10) トウモロコシ茎頂組織への遺伝子導入

Gould らの報告 (Gould J. et al., 1991; Plant Physiol. 95:426-434) による生長点組織 (茎頂組織) を材料とした形質転換が可能であることを確認するため、前述のアグロバクテリウム菌系EHA101(pIG121Hm)を単離したトウモロコシ茎頂組織に処理し、生長した植物体でのGUS活性を調査した。アグロバクテリウム非処理の組織ではいずれもGUS遺伝子の発現はみられなかったが、アグロバクテリウム処理した組織では針で穿刺した部分にGUS遺伝子の発現が小さな点状に認められた。しかし、その後培養を続けた植物体でGUS活性を調査したところ、GUS遺伝子の発現を示すものは全くなかった。生長点近傍は非常に微細な組織であり、そこに穿刺しアグロバクテリウムを感染させることは容易でない。本実験の結果から生長点近傍へのアグロバクテリウムによる形質転換には生長点の切り出し、穿刺などに熟練した技術が必要であると考えられた。

表1 トウモロコシ茎頂組織への遺伝子導入

供試 組織数	生長した 植物体数	得られた 植物体数	GUS + 植物体数
24	9	2	0
26	8	6	0
17	13	5	0
14	1	0	0
45	14	7	0
32	14	8	0
30	7	1	0

供試品種はいずれもP3732

(11) トウモロコシ未熟胚への接種

トウモロコシ未熟胚を材料として、アグロバクテリウムを処理した場合、供試したいずれの品種でも高率でGUS遺伝子の発現がみられた。GUS遺伝子の発現部位は肉眼ではっきりと確認できる大きさであり、広範囲の細胞で遺伝子発現

がなされた。また、E H A 1 0 1 (pIG121Hm)、L B A 4 4 0 4 (pTOK232)およびL B A 4 4 0 4 (pSB131)の菌系間での遺伝子発現率の差は認められなかった。これらのことからアグロバクテリウムによる形質転換法において、未熟胚は安定して高率の感染を示す適当な材料であると判断される。

表2 トウモロコシ未熟胚へのGUS遺伝子導入効率

品種	菌系	GUS+組織数／供試組織数(%)
A188	1	32.32(100)
A188xB73Ht	1	32.32(100)
B73HtxA188	1	76.77(99)
BMSxA188	1	63.63(100)
A188	2	65.66(98)
H84	2	26.30(84)
B37Ht	2	20.20(100)
Mol7Ht	2	24.25(96)
W117Ht	2	15.15(100)
Oh43	2	17.20(85)
H99	2	25.25(100)
W64A Ht rhm	2	10.10(100)
A188xB73Ht	2	34.34(100)
B73HtxA188	2	49.49(100)
BMSxA188	2	59.59(100)
A188	3	15.16(94)
H84xA188	3	20.20(100)
Mol7Ht x A188	3	8.10(80)
C103xA188	3	11.11(100)

BMS:Black Mexican Sweet

菌系 1:EHA101(p1G121Hm), 2:LBA4404(pTOK232), 3:LBA4404(pSB131)

(12) 前培養したトウモロコシ未熟胚への接種 (比較例)

Chanらはイネのアグロバクテリウムによる形質転換の材料に N_6 RD培地 (N_6 主要塩類、 N_6 微量塩類、 N_6 ビタミン類、3%ショ糖、0.8%アガロース、2 mg/l 2, 4-D) で2日間培養 (脱分化処理) した未熟胚を用いている (Chan M. T. et al., 1993; Plant Mol. Biol. 22:491-506)。トウモロコシ未熟胚を用いた場合にもこの方法が有効であることを確認するため、LSD 1.5カルス誘導培地で2日間培養した未熟胚 (品種A188) を材料にアグロバクテリウムによる形質転換を試みた。接種および共存培養は前述の方法に従った。供試菌系はLAB4404(pSB131) とした。対照として採取直後の未熟胚を同様に試験に供した。共存培養3日目に両試験区の未熟胚をGUS染色したところ、採取直後に接種処理を施した未熟胚のほとんどが染色されたのに対し、前培養後にアグロバクテリウムを接種した未熟胚では染色されるものは全く見られなかった (表3)。このことから、前培養した未熟胚を材料とした場合、トウモロコシの形質転換は達成されないことが明白である。

表3 前培養したトウモロコシ未熟胚へのGUS遺伝子導入効率

未熟胚	供試組織数	GUS+組織数
2日間培養	21	0
採取直後	20	19

(13) トウモロコシ形質転換細胞の確認

30 mg/l および50 mg/l ハイグロマイシン添加培地上で選抜し、75 mg/l ハイグロマイシンを含む培地で抵抗性の確認をしたカルスをGUS染色したところ、カルス全体でGUS遺伝子の発現が認められた。このカルスから小鞠らの方法 (Komari et al. 1989; Theor. Appl. Genet. 77:547-552) に従い抽出したDNAを鋳型とし、GUS遺伝子を増幅させるプライマー (5'-ATGTTACGTCCTGTAGAAAC-3'、5'-ATGGTGC GCCAGGAGAGTTG-3') を用いて複製連鎖反応

(PCR)を実施した。反応は、1 μ lのDNA溶液、5 pMの各々のプライマーの混合物、200 μ MのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、PCR緩衝液(宝酒造社製)および2.5 UのAmplitaq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を使用して全容積100 μ lで行なった。反応は下記の温度のプロファイルに従って30周期を繰り返した; DNAサーモサイクラー(パーキン エルマー セタス社製)中で: 1分間にわたり94 $^{\circ}$ C、2分間にわたり55 $^{\circ}$ C、および3分間にわたり72 $^{\circ}$ C。PCR生成物を、0.7%アガロースゲル上で電気泳動によって分離した。アグロバクテリウム非感染カルスから抽出したDNAを鋳型とした場合、DNAの増幅断片は検出されなかったが、LBA4404 (pTOK232)および抵抗性カルスから抽出したDNAを鋳型とした場合、電気泳動によって1.8 kbpの増幅断片がエチジウムブロマイド染色法により検出された。また、アグロバクテリウムのVirG開始コドンを含む795 bpの領域を増幅させるプライマー (5'-GACGTTTATGAAGTAGGCGAGA-3'、5'-TAAAAACGCGAGGAGAAGATTG-3')を用いたPCRを実施した。LBA4404 (pTOK232)を鋳型とした場合0.8 kbpの増幅断片が検出されたが、抵抗性カルスおよびアグロバクテリウム非感染カルスから抽出したDNAを鋳型とした場合、増幅断片は検出されなかった。このことから、抵抗性カルス全体でみられたGUS遺伝子の発現はカルスに付着したアグロバクテリウムによるものではなく、導入されたGUS遺伝子によるものであり、段階的にハイグロマイシン濃度を高めた培地上で増殖したコンパクトで、こぶ状のカルスは形質転換体であると考えられた。

(14) トウモロコシ形質転換植物体の選抜

共存培養後、30~100 mg lのハイグロマイシンまたは5~20 mg lのPPTを含む培地上で抵抗性カルスの選抜を行ったところ、ハイグロマイシン選抜では供試した未熟胚の11~27%、PPT選抜では同じく35~64%から抵抗性カルスが得られた(表4、6)。これらのカルスをハイグロマイシンまたはPPTを含む植物体再分化培地に置床したところ高率で植物体の再分化がみられた。再生した植物の葉をGUS染色したところ多くの個体でGUS遺伝子の発現が認められ(表5、6)、これらは形質転換植物であると考えられた。形質転換植物の得られる頻度

は特にPPT で選抜を行った場合に高く、また実験間での差も少なく常に供試した未熟胚の10% 以上のものから独立の形質転換植物が得られた（表6）。このことは本法が安定して高頻度で形質転換がなされる方法であることを示唆する。次に接種からカルス増殖まで同じ条件で培養、選抜されたPPT 抵抗性カルスを高濃度（20 mg/l）のPPT を含む再分化培地とPPT を含まない再分化培地にそれぞれ置床し、再分化した植物体のGUS発現と調査したところPPT を含む培地で再分化した植物体ではキメラ個体やエスケープ（GUS-）個体が少なく、再分化時のPPT 添加による選抜効果が確認された（表7）。

表4 ハイグロマイシン選抜によるトウモロコシ未熟胚の形質転換効率

実験	ハイグロマイシン 選抜経過(mg/l)	ハイグロマイシン 抵抗性カルス数 / 供試未熟胚数 (%)
1	0-30- 50	5.22(23)
2	0-30- 50	6.22(27)
3	0-30-100	2.19(11)

ハイグロマイシン選抜は共存培養後、各濃度で2 ～3 週間ずつ培養した。

表5 ハイグロマイシン選抜による形質転換植物体の選抜効率

実験	ハイグロマイシン 抵抗性カルス数	植物体 再生カルス数	GUS+ 植物体数
1	64	11	5
2	15	8	7
3	20	3	2

表 6 PPT 選抜による形質転換効率

実験	供試 未熟胚数	増殖 未熟胚数(%)	再分化 未熟胚数(%)	G U S + 植物体数(%)
1	364	200(55)	71(20)	44(12)
2	121	42(35)	31(26)	20(17)
3	68	28(41)	17(25)	9(13)
4	44	28(64)	9(20)	6(14)

各欄の未熟胚数および植物体数はクローンを含まない数

表 7 再分化培地中へのPPT 添加が再分化効率および形質転換効率に及ぼす影響

PPT 添加	供試 カルス数	再分化 カルス数(%)	再分化植物体の G U S 染色率(%)		
			GUS+	キメラ	GUS-
+	714	335(47)	74	17	9
-	350	184(53)	40	33	27

PPT添加濃度 + : 20 mg/l, - : 0 mg/l

(15) トウモロコシ形質転換当代における導入遺伝子のサザン解析

形質転換体の全DNAをBamHI で切断した断片に対してb a rおよびG U S遺伝子をプローブとしたサザン法により形質転換当代における導入遺伝子の検出を行った。いずれの遺伝子をプローブとした場合でも供試した全ての個体で1～数コピーの導入遺伝子の存在が認められた(表8)。プラスミドpSB131の中ではb a r遺伝子を含むBamHI断片は2.7kb、G U S遺伝子を含む同断片は2.3kbであるのに対し供試した全ての形質転換体には約3kb以上のバンドが認められた。このことはb a r、G U Sの両遺伝子とも植物染色体に組み込まれたことを裏付

けるものである。また検出されたDNA断片の長さは由来の違う個体では全て異なった。これはトウモロコシの染色体への遺伝子導入箇所がそれぞれ異なることを示すものであり、植物体内でのバクテリアの残存によるものではないことが確認された。

表8 サザン解析による形質転換当代における
導入遺伝子のコピー数

形質転換個体 (当代)	導入遺伝子コピー数	
	b a r	G U S
対照	—	—
転換体 1	2	2
2 a	2	1
2 b	2	1
3	2	1
4 a	2	1
4 b	2	1
5	2	2
6	3	1
7	2	1
8	2	2
9 a	1	1
9 b	1	1
10	1	1

(16) pTOK233 を導入したトウモロコシの次世代における導入遺伝子の発現と分析

ハイグロマイシンによる選抜後得られた形質転換植物と非形質転換植物を交配し

て得られた次世代植物の葉をGUS染色したところGUS陽性と陰性の比は、ほぼ1:1 に分離し予想された分離比に適合した(表9)。

表9 ハイグロマイシン選抜によるトウモロコシ

形質転換個体の次世代における導入遺伝子の発現

形質転換個体	次世代個体数	
	GUS発現	
	陽性	陰性
対照	0	5
転換体 1 1	4	5
1 2	5	6

(17) pSB131を導入したトウモロコシの次世代における導入遺伝子の発現
 対照品種の葉をGUS染色したところ全て陰性であったのに対し、形質転換植物を自殖して得られた次世代の葉は1 個体を除き全て陽性を示した。さらにこれらの植物体にバスタを塗布したところ対照品種の葉は約2 週間で全て枯死したが形質転換次世代の葉はGUS陰性を示した個体を除き全て健全であった(表10)。GUS遺伝子の発現、PPT 抵抗性ともに2 因子分離に適合する遺伝的分離を示した。次に対照品種より採取した未熟胚をPPT 含有培地で培養したところ全ての未熟胚が増殖を抑制されカルス誘導はみられなかった。これに対し形質転換植物と非形質転換植物を交配して得られた次世代植物から採取した未熟胚では供試した両系統とも置床した未熟胚の約50% からカルスが誘導され、その後同培地上で旺盛な増殖を示した(表11)。これらの増殖したカルスをGUS染色したところいずれのカルスでも全体が青色に呈色された。

表 1 0 P P T 選抜によるトウモロコシ形質転換個体の次世代における
導入遺伝子の発現（幼苗での検定）

形質転換個体	コピー数		次世代個体数			
			P P T 抵抗性		G U S	
	b a r	G U S	抵抗性	感受性	陽性	陰性
対照	—	—	0	5 0	0	5 0
転換体 2 1	2	2	4 9	1	4 9	1

表 1 1 P P T 選抜によるトウモロコシ形質転換個体の
次世代における導入遺伝子の発現（未熟胚による検定）

形質転換個体	次世代未熟胚数	
	P P T 抵抗性	
	抵抗性	感受性
対照	0	7 6
転換体 3 1	2 9	3 2
3 2	2 2	2 5

（ 1 8 ） pSB131を導入したトウモロコシの次世代における導入遺伝子のサザン解析

表 1 0 に示した形質転換個体 No. 21 を自殖して得られた次世代植物から DNA を

抽出し前述と同様の方法でサザン法による導入遺伝子の検出を行った。植物体でのGUS遺伝子の発現が陰性、PPT感受性であった個体を除き、全ての個体でいずれの遺伝子をプローブとした場合でも導入遺伝子の存在が認められた(表12)。導入遺伝子の存在が認められた個体はいずれもbar、GUSのコピー数が一致し、またそれぞれのバンドの長さは形質転換当代の個体のものと同一であった。以上の結果から本法によりアグロバクテリウムを用いてトウモロコシに導入された遺伝子が植物の細胞の核に組み込まれメンデルの遺伝に従って安定して後代に遺伝することが確認された。

表12 サザン解析による形質転換次世代における
導入遺伝子のコピー数

形質転換個体 (次代)	導入遺伝子コピー数	
	bar	GUS
対照	—	—
21-1	1	1
-2	2	2
-3	1	1
-4	1	1
-5	0	0
-6	1	1
-7	1	1
-8	2	2
-9	1	1
-10	2	2
-11	1	1

(19) イネ未熟胚への接種

トウモロコシ未熟胚を材料としたときと同様に、イネ未熟胚においても高率でGUS遺伝子の発現が認められ、特にスーパーバイナリーベクターを有する菌系であるLBA4404(pTOK232)を用いた場合に顕著に高い効率でGUS遺伝子の発現が認められた(表13)。

表13 イネ未熟胚へのGUS遺伝子導入効率

菌系	GUS+の組織数/処理組織数 (%)
無処理	0 / 50 (0)
EHA101(pIG121Hm)	66 / 198 (33)
LBA4404(pTOK232)	52 / 52 (100)

この実験で使用した2種類のバイナリーベクターはアグロバクテリウムの細胞の中ではGUS遺伝子は発現しないことから、共存培養後のGUS遺伝子を指標とした場合、アグロバクテリウムはトウモロコシおよびイネの細胞に遺伝子を導入できることが確認された。

(20) イネ形質転換植物体の選抜

イネ未熟胚において、50 mg/l ハイグロマイシン添加培地上で抵抗性カルスの選抜を行ったところ、スーパーバイナリーベクターを有する菌系を用いた場合に、顕著に高い効率で抵抗性カルスが得られた(表14)。これらは、選抜マーカーを含む植物体再生培地に移植することにより、容易に再生植物体を得られた(表14)。また、再生植物の葉におけるGUS発現を調査したところ、いずれの個体においてもGUS遺伝子の発現が認められ、形質転換植物であると考えられた。アグロバクテリウムの菌系EHA101(pIG121Hm)は、強病原性のpTiBo542のウィルレンス領域を有するものの、スーパーバイナリーベクターを有していない。Chanらが用いた菌系も同様な菌系であり、本実施例の結果と同様に非常に低い形質転換効率しか得られていない(Chan M. T. et al., 1993; Plant Mol. Biol. 22:491-506)。これに対し、スーパーバイナリーベクターを有する菌系を用いることにより、飛躍的に高い効率でイネ未熟胚から形質転換植物が得られること

が本実施例において明かとなった。

表 1 4 イネ未熟胚における形質転換体の選抜結果

菌系	組織数 (%)			選抜 薬剤
	供試 未熟胚	抵抗性 カルス	植物体再生 カルス	
無処理	4 0	0 (0)	0 (0)	HYG
EHA101(pIG121Hm)	7 1	3 (4)	1 (1)	HYG
LBA4404(pTOK232)	7 7	2 3 (3 0)	1 7 (2 2)	HYG

HYG : ハイグロマイシン

(2 1) イネ形質転換個体における導入遺伝子の確認

LBA4404(pTOK232)をイネ未熟胚に処理することにより得られた任意かつ独立な形質転換植物 3 個体について、導入遺伝子の存在を複製連鎖反応 (P C R) 法により調査した。G U S 遺伝子およびHPT 遺伝子のプライマーには構造領域の両端を用いた。対照として非形質転換体のDNAおよび各遺伝子を有するプラスミドDNAを用いた。その結果、LBA4404(pTOK232)を処理することにより得られた形質転換体で、対照のプラスミドにおけるのと同様に、3 個体ともHPT 遺伝子の1.1 kbの増幅断片が検出された。また、G U S 遺伝子についてもすべての個体で対照プラスミドと同様の1.8 kbの増幅断片が検出された。非形質転換体ではこれらの断片は検出されなかったことから、供試植物体はアグロバクテリウムにより導入された遺伝子を有する形質転換植物体であることが確認された。

産業上の利用可能性

上述のように、本発明の方法は、従来の方法に比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、プロトプラストからの植物体の再生が確立されていない植物に対しても普遍的に適用することができ、特殊な装置を必要とせず、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法であるので、本発明は、

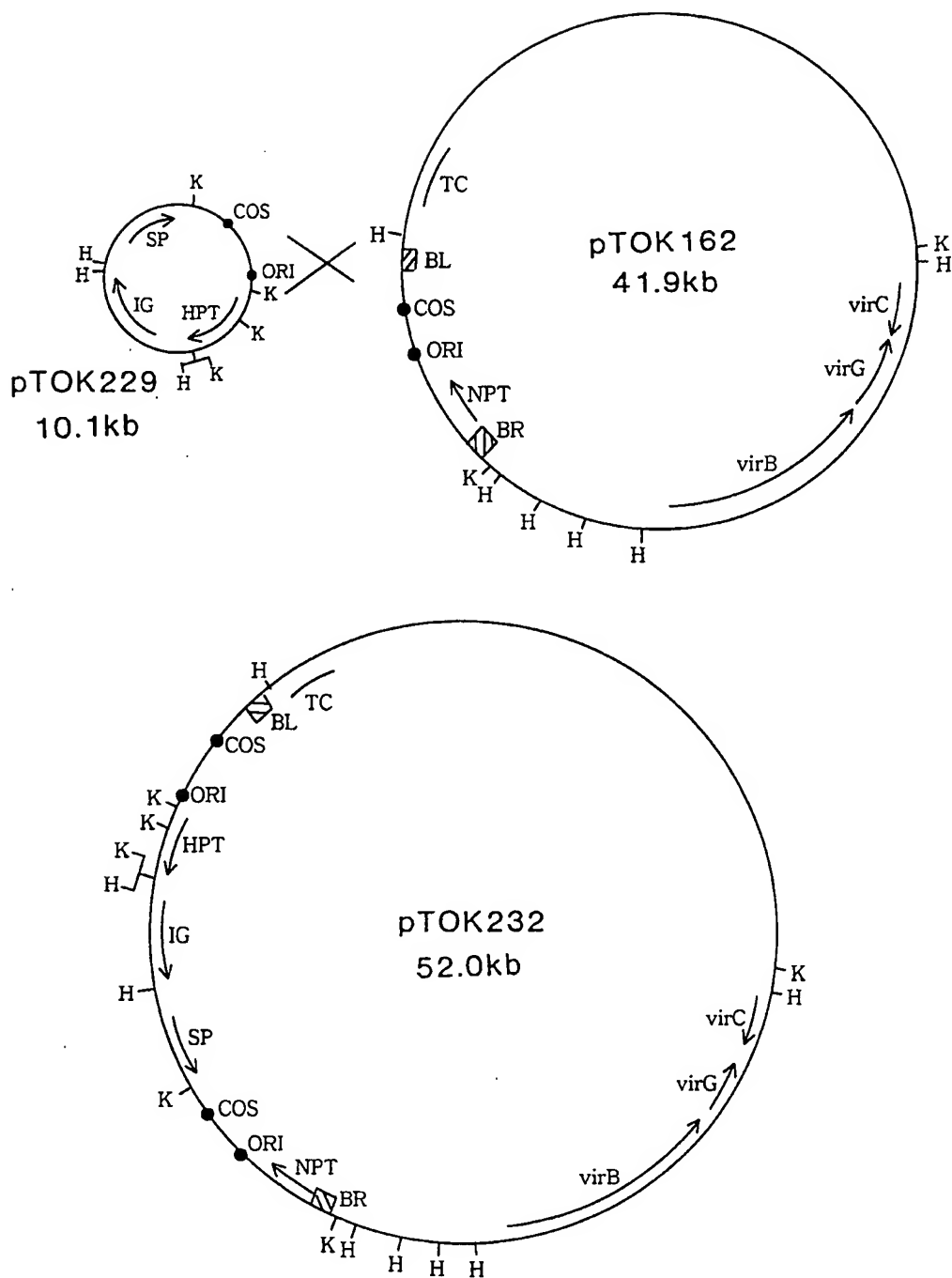
有用な性質を有する単子葉植物の育種に利用可能である。

請求の範囲

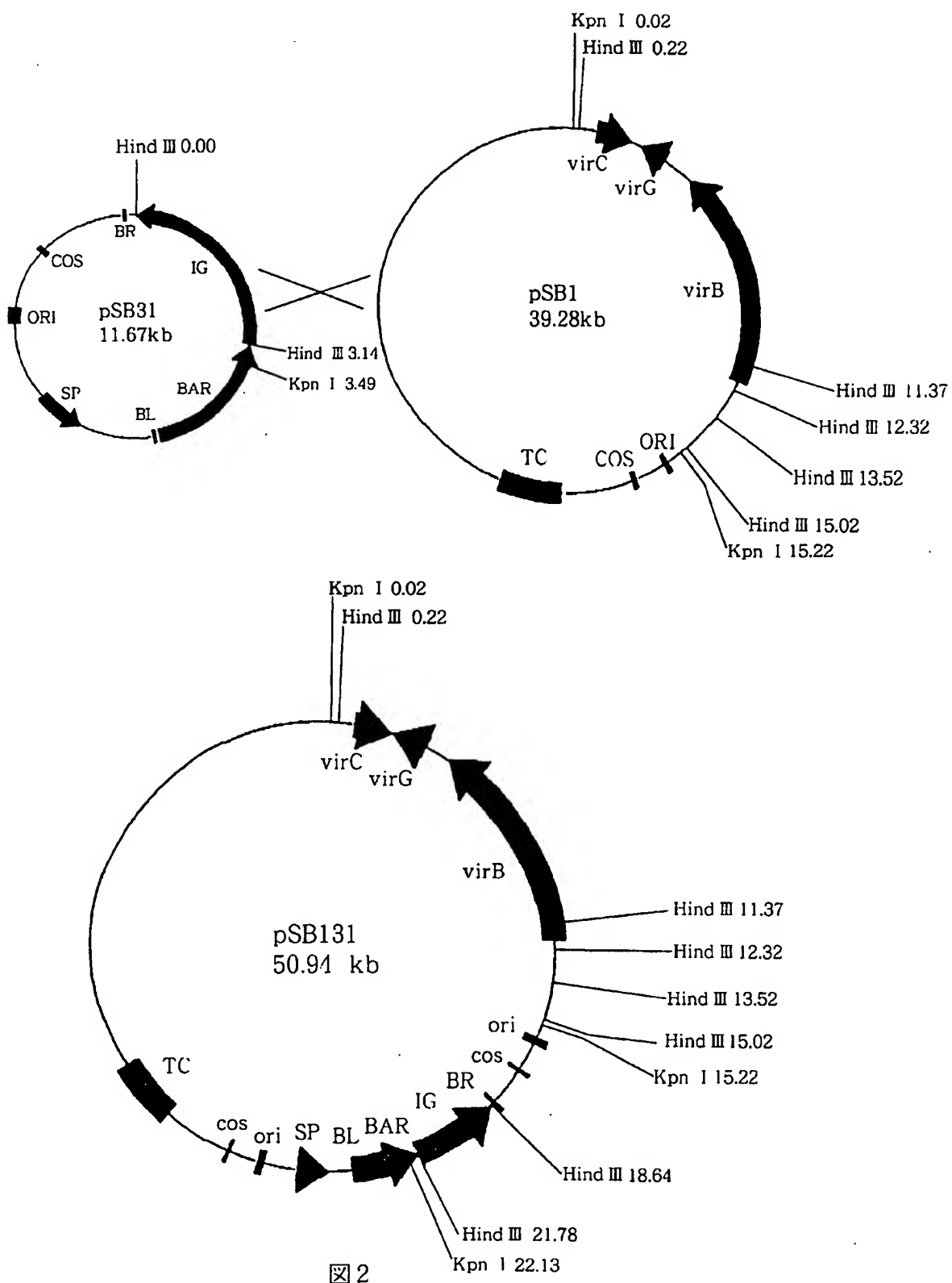
1. 所望の遺伝子を含有するアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化処理していない未熟胚の胚盤を形質転換し、形質転換個体を得ることからなる、単子葉植物の形質転換方法。
2. 前記単子葉植物がイネ科植物である請求項1記載の方法。
3. 前記イネ科植物がトウモロコシである請求項2記載の方法。
4. 前記イネ科植物がイネである請求項2記載の方法。
5. 前記未熟胚を酵素処理や付傷するなどの前処理を行わず形質転換に供する請求項1記載の方法。
6. 前記単子葉植物がトウモロコシであり、前記未熟胚を酵素処理や付傷するなどの前処理を行わず形質転換に供する請求項1記載の方法。
7. 前記未熟胚胚盤を形質転換処理後、脱分化させ、脱分化状態で形質転換細胞の選抜、増殖を行う請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。
8. 脱分化状態で選抜、増殖した形質転換細胞から正常稔性を有する形質転換個体を再生する請求項7記載の方法。
9. 前記アグロバクテリウム属細菌は、T i または R i プラスミドを持つアグロバクテリウム属細菌であって、さらに Agrobacterium tumefaciens の T i プラスミド p T i B o 5 4 2 のヴィルレンス領域由来の DNA 断片を含むプラスミドを導入したアグロバクテリウム属細菌である請求項1ないし8のいずれか1項に記載の方法。
10. 前記アグロバクテリウム属細菌は、Agrobacterium tumefaciens である請求項1ないし9のいずれか1項に記載の方法。
11. 形質転換操作に用いるアグロバクテリウム属細菌の菌濃度が $10^6 \sim 10^{11}$ 細胞/ml である請求項1ないし10のいずれか1項に記載の方法。
12. 前記未熟胚は受粉後2日以降の未熟胚である請求項1ないし11のいずれか1項に記載の方法。
13. 前記未熟胚胚盤が正常な個体を再生する能力を有するカルスを誘導できる未熟胚胚盤である請求項1ないし12のいずれか1項に記載の方法。
14. 形質転換細胞の選抜、増殖および再分化を行うため未熟胚から脱分化した

培養組織が未熟胚の胚盤由来カルスである請求項 7 又は 8 に記載の方法。

15. 前記の未熟胚がインブレッド、インブレッド間の F 1、インブレッドと自然受粉品種間の F 1、市販 F 1 品種のものである請求項 1 の方法。



☒ 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/00, A01H1/00 // C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C12N15/84, A01H1/00 // C12N5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Plant Molecular Biology, Vol. 22, No. 3 (1993) M-T. Chan, et al "Agrobacterium Mediated production of transgenic rice Plants expressing a chimeric alpha amylase Promoter-beta glucuronidase gene", P. 491-506	1-15
A	Plant Molecular Biology, Vol. 20, No. 6 (1992) X-Q. Li, et al "Factors influencing Agrobacterium mediated transient expression of GUS A in rice", P. 1037-1048	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 16, 1994 (16. 11. 94)

Date of mailing of the international search report

December 6, 1994 (06. 12. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. ⁸ C12N15/00.A01H1/00 // C12N5/00			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. ⁸ C12N15/84.A01H1/00 // C12N5/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
WPI.WPI/L.BIOSIS PREVIEWS			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	Plant Molecular Biology, 第22巻, 第3号 (1993) M-T. Chan, et al 「Agrobacterium Mediated production of transgenic rice Plants expressing a chimeric alpha amylase Promoter-beta glucuronidase gene」 p.491-506	1-15	
A	Plant Molecular Biology, 第20巻, 第6号 (1992) X-Q. Li, et al 「Factors influencing	1-15	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日 の後に公表された文献		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため に引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規 性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性 がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 16. 11. 934		国際調査報告の発送日 06.12.94	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 植 野 浩 志	4 B 9 2 8 1
		電話番号 03-3581-1101 内線	3449

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	<p>Agrobacterium mediated transient expression of GUS A in rice] p. 1037-1048</p>	